



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **189**

(51) **МПК(2006) А 61 К**
39/00; 39/285

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 0800182
(22) 15.02.2008
(46) Бюл.52 (4), 2008
(71) Мирзоев Д.М. (ТJ).
(72) Мирзоев Д.М. (ТJ); Балышев В.М. (ТJ); Назаров С.К. (ТJ); Каримов Б. (ТJ); Тураев Р.А. (ТJ).
(73) Мирзоев Д.М. (ТJ).
(56) 1. Методические указания по поддержанию прививаемых клеточных линий и хранению их расплодок в жидком азоте. Москва, 1979 г.
2. Методические указания по перфузионной дезогрегации почек поросят, телят и ягнят для получения свежеизолированных клеток и их вы-

2

ращиванию в пристеночных культурах. Москва, 1990 г.
(54) **СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВИРУСВАКЦИНЫ ОСПЫ КОЗ.**
(57) Изобретение относится к ветеринарии, а именно к изготовлению вакцин.

Способ включает изготовление вакцины по общеизвестному способу. При этом используют вируссодержащий патологический материал, содержащий эпизоотический местный штамм вируса оспы коз «Д» и проводят его 10-кратное разведение.

Изобретение относится к ветеринарии, а именно к изготовлению вакцин.

Наиболее близким к заявляемому является известный способ изготовления вакцины (1, 2), имеющий некоторые сходные с заявляемой разработкой существенные признаки такие как, приготовление первично-трипсинизированной культуры клеток; использование сыворотки крупного рогатого скота и питательной среды Игла-МЭМ и суспензии трипановой сини в соотношении 1:1; разливание на стерильные матрасы емкостью 100, 200, 500 и 1000 мл; хранение в течение суток в термостате или в инкубаторе при $t=+37+38^{\circ}\text{C}$; добавление суспензии, содержащей вирусный штамм; последовательное разведение вируса ($с 10^{-1}$ до 10^{-12}) в поддерживающей среде Игла-МЭМ; определение стерильности; использование лактозы (4%) и пептонный 20% стабилизатор для лиофилизации; изучение биологической и вирулентной характеристик путем введения штамма.

Недостатками прототипа являются дефицит, дороговизна и низкий показатель эпизоотической эффективности вакцины.

Целью изобретения является разработка новой, дешевой и более подходящей для условий Таджикистана вакцины для профилактики оспы коз, причем из эпизоотических лиофилизированных штаммов вируса оспы коз с повышенной эффективностью воздействия.

Поставленная цель была достигнута на основе изучения выявленных местных штаммов коз хозяйств (Дангаринского р-на) Республики Таджикистан. При изучении штаммов были проведены общеизвестные методы и способы, заключающиеся в следующем:

1. Приготовление первичнотрипсинизированных культур клеток.

Для получения культуры клеток проводили обескровливание суягных (беременных) коз и овец, затем извлекали плоды ягнят и козлят. В асептических условиях от плодов отбирали почки, легкие и тестикулы. Органы отмывали от крови рабочим раствором Хенкса с добавлением антибиотика (200 ЕД бензилпенициллина калиевая соль и 200 мкг стрептомицина сульфат на см^3). После этого в легкие вводили 0,25% раствор трипсина ($t=+37^{\circ}\text{C}$) до появления разрывов под оболочкой (другие органы погружали в этот же раствор). Затем органы измельчали ножницами на кусочки размером 2-3 мм. Измельченную ткань промывали рабочим раствором Хенкса с антибиотиками до просветления надосадочной жидкости. Промытую ткань заливали 0,25%-ым раствором трипсина ($t=+37^{\circ}\text{C}$) и помещали на магнитную мешалку в течение 10-15 минут. После этого надосадок сливали, а в колбу заливали свежий раствор трипсина. Дезагрегацию повторяли до полного истощения ткани. Полученный надосадок центрифугировали при 1000 об/мин-10 минут. Надосадок ресуспендировали питательной средой Игла - МЭМ с добав-

лением 10 % сыворотки крови козы и вносили в культуральные сосуды.

2. Для выращивания и поддержания культуры клеток использовали сыворотку крупного рогатого скота и питательную среду Игла-МЭМ.

3. Из полученной суспензии брали 0,5 мл и добавляли трипановую синь в соотношении 1:1 и встряхивали. Трипановую синь готовили по схеме: 500 мг порошка на 100 мл дистиллированной воды. Эта процедура нужна для подсчета количества клеток. Мертвые клетки окрашивались краской синего цвета. Количество клеток вычисляли по формуле:

$$H = \frac{X \cdot 1000 \cdot 2}{0,9},$$

где, H - концентрация клеток (тысяча клеток /1 мл); X- количество клеток в камере; 2- коэффициент разведения.

Посадочная концентрация культуры клеток 100-120 тысяч клеток в 1 мл. Если количество клеток выше 100 - 120 тысяч клеток в 1 мл, тогда следует разбавить питательной средой до нужной концентрации.

4. Готовую суспензию культуры клеток разливали на стерильные матрасы емкостью 100 мл - 200 мл.

5. После чего, матрасы оставили в термостат ($37-38^{\circ}\text{C}$) под резиновыми пробками или в инкубаторе под ватно-марлевыми пробками на сутки.

6. Затем всю суспензию сливали из матрасов и туда же наливали суспензию из патологического материала, содержащий вирусный штамм «Д» и оставляли на 48 часов. После чего сливали весь материал с вирусами. Готовили последовательные 15-кратные разведения вируса ($с 10^{-1}$ до 10^{-12}) в поддерживающей среде Игла-МЭМ. Каждое разведение вируса вносили по 1 см^3 в 4 пробирки с суточным монослоем клеток. В качестве контроля брали пробирки с неинфицированной культурой клеток. Культивирование вируса проводили при температуре $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Через каждые 2-3 суток производили смену поддерживающей среды. Пробирки ежедневно в течение 15 суток просматривали под световым микроскопом на наличие цитопатических изменений. Титр вируса определяли по методу Риза и Менча.

7. Определение стерильности проводили по ГОСТ- 2885-89.

Отсутствие в пробирках роста грибной и бактериальной микрофлоры указывало на стерильность проверяемого образца.

8. Для лиофилизации использовали лактозу (4%), пептонный 20% стабилизатор, который смешивали в равных объемах с культуральным вирусом, полученным в клинических матрасах. Техническую жидкость разливали по ампулам (0,3-0,5 см^3), промораживали при -50°C и лиофилизировали на сублимационных установках Heto и Hetosicc. Лيوфилизацию материала проводили в течение 18-

20 часов при остаточном давлении в камере 45-70 мкм рт. ст. Досушивание вируса вели при -18-20° С в течение 3-4 часов. Отпайку ампул проводили без вакуума в потоке стерильного воздуха.

9. Биологическую характеристику изучали путём введения изучаемого штамма овцам, козам, кроликам и белым мышам.

10. Маркерная характеристика:

Иммунологические свойства и безвредность изучали после приготовления вакцины из вышеуказанных штаммов и вакцинировали по 2 головы из каждой серии, на козах 6-7 месячного возраста, которых прививали опытными сериями препарата в количестве 1-ой прививочной дозы. Материал вводили подкожно в подмышечную область в объёме 1,0 см³ через 14 суток после прививки, этих коз и одну контрольную заразили внутрикожно в подхвостовую складку вирулентным вирусом ОК штамм «Д» в дозе 1000 ИД₅₀ в объёме 0,5 см³. После контрольного заражения у двух привитых коз в течение 3-4 суток отмечали повышение температуры тела, которое не превышало 40,5°С, без клинического проявления болезни. Титр ВН-антител в сыворотке крови опытных животных на 14 сутки после прививки составлял 1:2 - 1:4, что указывает на возможность использования этой реакции для оценки иммуногенности вакцины (исключая контрольное заражение). Контрольный козлёнок заболел на 4-е сутки и пал с характерными признаками оспы на 16 сутки после заражения. В течение 7-ми суток температурная реакция у него была в пределах 41,6 - 41,8°С. Учитывая имеющиеся сведения о возможной циркуляции в полевых условиях вируса оспы коз на овцах, была также изучена безвредность вирусвакцины для этого вида животных. С этой целью 2-м ягнятам 6-7-ми месячного возраста и 2-м взрослым овцам вводили смесь двух серий вакцины (подкожно в подмышечную область) в количестве 100 прививочных доз. За животными вели наблюдение с ежедневной термометрией в течение 21 суток. В течение этого срока козы оставались клинически здоровыми. На 6-7-е сутки у одной козы (привитой вирусвакциной серии № 1) отмечали 3-х дневное повышение температуры тела (до 40,7°С) без реакции на месте введения вируса. Таким образом, было показано, что испытуемые серии вирусвакцины безвредны для коз при введении им 100 при-

вивных доз вакцины. Овцы клинически не реагировали на вакцинацию, что указывает на безвредность вакцины, полученной на основе штамма «Д» и для этого вида животных. Таким образом, проведённые исследования указывают на безвредность и иммуногенность экспериментальной серии вирусвакцины, полученной на основе штамма «Д» для коз. Вакцина была также безвредна и для ягнят и взрослых овец. Производственные испытания этого образца вирусвакцины в полевых условиях были проведены в хозяйствах Оксу, С. Кабирова и Дангара Дангаринского района на 1250 головах коз и на 800 головах овец.

11. Биотехнологическая характеристика (название и свойства полезного штамма вируса).

12. Вирулентная характеристика: вирулентность определяли путём введения вирулентным вирусом ОК штамма «Д» в дозе 1000 ИД₅₀ в объёме 0,5 см³ внутрикожно в подхвостовую складку 6-7 месячного возраста козы.

13. Признаки штаммов вируса оспы коз:

а) родословные вирусы;

б) проведено 20 пассажей с целью изучения его реверсibility путём введения культурального вируса на восприимчивых животных и в культуре клеток;

в) ростовая характеристика (выращивание вируса в культуре клеток) - проводили по стандартным общепринятым условиям.

Результаты исследования показали, что выделенный эпизоотический штамм вируса оспы коз «Д» является стабильным без участия посторонних микрофлор и вирулентным для коз.

Результаты экспериментальных и производственных опытов показывают, что вирусвакцина, производимая из эпизоотических штаммов вируса оспы коз «Д» является безвредной и иммуногенной. Его применение позволит предупреждать заболевание коз оспой и повышать сохранность коз до 98-100%.

Изобретение позволяет проводить профилактику оспы коз, выявлять эпизоотические штаммы вирусов и своевременно проводить вакцинацию из того же вида штамма вируса, а также по регионам определять и оккупировать вспышки оспы коз и овец.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ изготовления вирусвакцины оспы коз, включающий приготовление первично-трипсицизированной культуры клеток, использо-

вание сыворотки крупного рогатого скота и питательной среды Игла-МЭМ, добавление и встряхивание в 0,5 мл суспензии трипановой сини в соот-

ношении 1:1, разливание на стерильные матрасы, хранение в термостате при $t=+37+38^{\circ}\text{C}$ или в ин-

7

кубаторе в течение суток, добавление суспензии, содержащей вирусный штамм, последовательное разведение вируса (с 10^{-1} до 10^{-12}) в поддерживающей среде Игла-МЭМ, определение стерильности, использование лактозы (4%) и пептонного 20% стабилизатора для лиофилизации, изучение биоло-

гической и вирулентной характеристик путем введения штамма, **отличающийся тем, что** исполь-

8

зуют вируссодержащий патологический материал, содержащий эпизоотический местный штамм вируса оспы коз «Д» и проводят его 10-кратное разведение.

189

Компьютерный набор: Назарова Дж.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.